

518 915
23 DEC 2004

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2003年10月16日 (16.10.2003)

PCT

(10)国際公開番号
WO 03/084302 A2

- (51) 国際特許分類: 分類無し
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/07752
- (22) 国際出願日: 2003年6月18日 (18.06.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-185036 2002年6月25日 (25.06.2002) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社資生堂 (SHISEIDO COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒104-8010 東京都中央区銀座7丁目5番5号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 矢野喜一郎 (YANO,Kiichiro) [JP/JP]; 〒224-8558 神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株式会社資生堂リサーチセンター(新横浜)内 Kanagawa (JP). 加治屋健太朗 (KAJIYA,Kentaro) [JP/JP]; 〒236-8643 神奈川県横浜
- (74) 代理人: 青木篤, 外 (AOKI,Atsushi et al.); 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(国内): CN, JP, KR, US.
- (84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- 添付公開書類:
 — 出願人の請求に基づく第21条(2)(a)による期間経過前の公開。
 — 國際調査報告書なし; 報告書を受け取り次第公開される。
 — 分類なし; 國際調査機関により点検されていない発明の名称及び要約。
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: ANTI-AGING AGENT

(54) 発明の名称: 抗老化剤

(57) Abstract: A neovascularization inhibitor or an anti-aging agent, characterized in that it comprises one or plural types of drug selected from the group consisting of Zizyphus jujuba Miller var. inermis Re hder extract, Panax ginseng C.A. Meyer extract, Anthemis nobilis Linne extract, Chlorella vulgaris Chick, Aplum graveolens Linne extract, Petroselinum sativum Hoffman extract, Coix lacryma-jobi Linne var. ma-yuen Stapf extract, and Bombyx mori Linnaeus extract.

(57) 要約:

本発明は、タイソウエキス、オタネニンジンエキス、ローマカミツレエキス、クロレラエキス、セロリエキス、パセリエキス、ヨクイニンエキス、シルクエキスから成る群から選ばれる1又は複数種の薬剤を含有することを特徴とする、血管新生阻害剤及び抗老化剤を提供する。

WO 03/084302 A2

明細書

抗老化剤

技術分野

本発明はTSP-1誘導活性を示し、且つ血管内皮細胞死を誘導することで血管新生を阻害する所定の薬剤を含有する血管新生阻害剤及び血管新生阻害活性を示すことで抗老化作用、特に抗光老化作用を発揮する所定の薬剤を有効成分として含有することを特徴とする抗老化剤、特に抗老化皮膚外用剤に関する。

背景技術

近年、皮膚老化に関する研究が進められている。皮膚老化の原因は、マクロ的にみれば加齢が重要な因子であるが、それに加えて乾燥、酸化、太陽光（紫外線）等による影響も皮膚老化に関わる直接的な因子として挙げられる。皮膚老化の具体的な現象としては、ヒアルロン酸をはじめとするムコ多糖類の減少、コラーゲンの架橋反応、紫外線による細胞の損傷などが知られている。

また、皮膚傷害を原因とする、あるいは紫外線暴露による皮膚老化を原因とする肌のしわ、こじわ、たるみ等の抑制、改善を目的とした様々な研究がなされ、例えばヒアルロン酸の産生促進（特開2001-163794号公報）、マトリックス・金属プロテイナーゼ(MMP)の產生・活性の抑制（特表2000-503660号公報）、コラーゲンの産生促進、エステラーゼの活性の阻害（特開平11-335235号公報）が有効であることが解明されている。また、そのような研究の成果としてヒアルロン酸やアミノ酸、種々の多価アルコール、糖類、更には様々な植物エキスが皮膚老化の抑制、改善に有効であることも見出さ

れている。

このような研究は主として表皮又は表皮細胞に注目してしわ等の抑制、改善を図っているが、これらとは別に、最近になって皮膚の血管系における内皮細胞も皮膚の老化に関与していることを示唆する報告がなされている。

本発明の課題は、皮膚血管系内皮細胞と皮膚老化との関係の観点から新たな皮膚老化の予防又は抑制に有効な薬剤を見出すことにある。

発明の開示

本発明者は鋭意検討の結果、所定の生薬、即ち、タイソウエキス、オタネニンジンエキス、ローマカミツレエキス、クロレラエキス、セロリエキス、パセリエキス、ヨクイニンエキス及びシルクエキスが血管新生を阻害し、その結果老化を効果的に予防又は抑制することを見出した。

従って、本発明はタイソウエキス、オタネニンジンエキス、ローマカミツレエキス、クロレラエキス、セロリエキス、パセリエキス、ヨクイニンエキス、シルクエキスから成る群から選ばれる1又は複数種の薬剤を含有することを特徴とする血管新生阻害剤を提供する。

より詳しくは、本発明はタイソウエキス、オタネニンジンエキス、ローマカミツレエキス、クロレラエキス、セロリエキス、パセリエキス、ヨクイニンエキス、シルクエキスから成る群から選ばれる1又は複数種の薬剤を含有することを特徴とする抗老化剤を提供する。かかる抗老化剤はしわの形成、特に光老化によるしわの形成を防止又は抑制するのに極めて有効である。

本発明は更に、老化を抑制するための方法であって、上記血管新

生阻害剤や抗老化剤を皮膚に塗布すること含んで成る方法に関する

。

皮膚の血管系は、正常皮膚の構造と機能を維持するために必須である。それ以上に、皮膚の血管系は毛髪の成長の制御、紫外線による皮膚損傷の鎮静、加齢による皮膚老化、刺激と炎症に対する皮膚反応ならびに組織の修復のそれぞれにおいて主要な役割を演じている。血管は正常な成人皮膚では定常的に働いているが、異なる刺激に対しては迅速に活性化し、そして血管拡張と既存の血管から新しい毛細血管を形成する血管新生を伴って反応する。これらの変化は、前血管新生分子（血管新生促進因子）と抗血管新生分子（血管新生抑制因子）の両方の間におけるバランスに依存している。そして、正常皮膚は、血管新生促進因子よりも内在性の血管新生抑制因子が優位に働いていることが判明している。

血管内皮増殖因子（V E G F）は、血管透過性因子としても知られているが、最近の研究によりヒト皮膚における主要な血管新生促進因子であることが示唆されている。正常な皮膚において、V E G Fはケラチノサイトにより少量分泌され、真皮の微小血管内皮細胞上の特異的なレセプターに結合し、それによって内皮細胞の生存能力を確保することにより、上部の網状構造の血管を維持している。炎症あるいは創傷治癒時の肥厚した表皮におけるVEGFは、非常に高く発現していて、それゆえ、血管が無い表皮のために真皮での血管の増加と栄養供給を導いている。

V E G Fとは対照的に、正常皮膚における血管新生抑制因子として主要な役割を演じているのは細胞外マトリックスタンパク質のトロンボスポンジン（T S P）ファミリーの二種、T S P - 1 と T S P - 2 である。T S Pは、基底層のケラチノサイトを含む数種の皮膚の細胞により発現していて、真皮一表皮間の基底膜領域に堆積し

、表皮の血管新生を防ぐ自然の抗血管新生バリアーとして働く。また、血管新生と血管の退行の間でTSPの発現が調節されていることも判明している。

TSP-1、TSP-2等の血管新生抑制因子ノックアウトモデル、又は皮膚において血管新生促進因子VEGFや血管新生抑制因子を過剰発現するトランスジェニックモデルを用いた *in vivo* の研究により、これらの血管新生促進因子や血管新生抑制因子のレベルの調節が、紫外線による損傷と皮膚のしわの程度、刺激性の皮膚反応、そして皮膚損傷の修復に著しい影響を及ぼすことが示された。

紫外線をマウスに長期間照射すると顕著なしわが形成されるが、驚くべきことに、その際に皮下血管の顕著な成長が、血管の拡大及び枝分かれの増大を伴って認められた。また、マウスに紫外線を長期間照射すると、血管内皮増殖因子の発現も亢進されることが見出された。このことからして、紫外線照射等の皮膚傷害によるしわの形成には、血管内皮細胞の新生が関与していることが明らかであり、換言すれば血管内皮細胞の新生を抑制し、しかも血管内皮細胞の細胞死を誘導することでしわの形成を抑制することができる事が明らかである。

そこで、血管新生抑制因子であるTSP-1の誘導に基づく血管新生阻害及び血管内皮細胞のアポトーシスの誘導に基づく血管新生阻害の双方の機構を利用し、皮膚老化を抑制する候補薬剤として多数の生薬をスクリーニングした結果、TSP-1を誘導し、しかも血管内皮細胞のアポトーシスを誘導する活性をもついくつかの生薬の存在が見出された。これらの生薬のうち、タイソウエキス、オタネニンジンエキス、ローマカミツレエキス、クロレラエキス、セロリエキス、パセリエキス、ヨクイニンエキス及びシルクエキスは血

管新生阻害作用や抗老化作用、特に光抗老化作用を示すことが従来技術において全く知られておらず、また示唆もされていない。

図面の簡単な説明

図1は、TSP-1誘導剤のスクリーニングの結果を示す。

図2は、アポトーシス誘導剤のスクリーニングの結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

血管新生抑制因子であるTSP-1を誘導する薬剤のスクリーニングは、下記の実施例、実験1において詳細に記載の通り、TSP-1プロモーターの下流にルシフェラーゼをレポーター遺伝子として結合させたDNA構築体を導入したHacat細胞株に各種候補薬剤を作用させ、ルシフェラーゼ活性の測定を行い、そのルシフェラーゼ活性をもってTSP-1プロモーター活性とし、TSP-1プロモーター活性を有する薬剤を有効薬剤として選定することで行なった。

TSP-1誘導剤は必ずしも血管内皮細胞死を誘導しない。例えば、TSP-1誘導物質のポジティブコントロールである線維芽細胞増殖因子(bFGF)や組織プラスミノーゲンアクチベーター(TPA)は血管内皮細胞で細胞死を誘導しない。よって、TSP-1誘導のみならず、TSP-1機能(血管内皮細胞の細胞死)を発揮する薬剤の同定のために、血管内皮細胞のアポトーシスを誘導する薬剤のスクリーニングを二次スクリーニングとして実施した。

血管内皮細胞のアポトーシスを誘導する薬剤のスクリーニングは、細胞に対するアポトーシス活性を測定する慣用の方法、具体的には下記の実施例、実験2において詳細に記載の通り、適当な細胞培養培地中の血管内皮細胞に候補薬剤を作用させ、当該細胞の細胞死

を計測し、当該細胞の細胞死を増強させる薬剤を有効薬剤として選定することで行なった。

その結果、以下の薬剤がTSP-1を誘導し、しかも血管内皮細胞のアポトーシスを誘導して血管新生を阻害できることが見出された。

タイソウエキス：ナツメの果実の抽出液。主成分として、サポニンやフルクトースなどの糖類、有機酸類の他に核酸関連物質であるサイクリックAMPという物質を含む。このサイクリックAMPに皮脂組織タンパク質の新生（再生）や皮脂分泌調整等の働きがある。

オタネニンジンエキス：別名チョウセンニンジンの抽出液。主成分として、ジンセノサイド、パナキシノール、 β -エレメンなどを含む。ジンセノサイドにタンパク質、DNA合成促進作用の働きがある。

ローマカミツレエキス：ヨーロッパ原産の1年草の抽出液。主成分として、テルペノアルコール、カマズレン、ノニル酸などを含む。乾燥した頭状花には抗炎症、食欲増進の働きがある。

クロレラエキス：淡水中に生息する単細胞植物より得られる抽出液。主成分として、アミノ酸、ビタミンを多く含む。細胞分裂作用、抗腫瘍作用などをもつ。

セロリエキス：南ヨーロパ原産の1年草の抽出液。主成分として、アピインと呼ばれるフラボン配糖体、マンニトール、ベルガプロン、イノシトールなどを含む。セロリエキスには降圧作用の働きがある。

パセリエキス：ヨーロッパ原産の多年草の抽出液。主成分として、アピオール、ミリスチシンなどを含む。このアピオールには利尿作用がある。

ヨクイニンエキス：ハトムギの種子の抽出液。主成分として、グルタミン酸、ロイシン、チロシンなどのアミノ酸の他、コイキセノライドを含む。このコイキセノライドは抗腫瘍成分として働く。

シルクエキス：家蚕から得られる絹繊維の抽出液。主成分として、約20種類のアミノ酸を含む。効能としては、細胞の再生、新陳代謝の促進などの働きがある。

上記エキスは常法により得ることができ、例えば各エキスの起源となる植物を抽出溶媒とともに浸漬または加熱還流した後、濾過し、濃縮して得ることができる。抽出溶媒としては、通常抽出に用いられる溶媒であれば任意に用いることができ、例えば、水、メタノール、エタノール、プロピレン glycole、1, 3-ブチレン glycole、グリセリン等のアルコール類、含水アルコール類、クロロホルム、ジクロルエタン、四塩化炭素、アセトン、酢酸エチル、ヘキサン等の有機溶媒等を、それぞれ単独あるいは組み合わせて用いることができる。上記溶媒で抽出して得られたエキスをそのまま、あるいは濃縮したエキスを吸着法、例えばイオン交換樹脂を用いて不純物を除去したものや、ポーラスポリマー（例えばアンバーライト XAD-2）のカラムにて吸着させた後、メタノールまたはエタノールで溶出し、濃縮したものも使用することができる。また分配法、例えば水／酢酸エチルで抽出したエキス等も用いられる。

本発明に係る上記薬剤は、血管内皮細胞の新生、成長、増殖を原因とする老化を予防、抑制するのに極めて有効である。血管内皮細胞の新生、成長、増殖を原因とする老化とは、皮膚傷害や紫外線に対する暴露による光老化等を意味する。本発明に係る薬剤は特に光老化の防止、抑制に有効である。

光老化とは、一般に日光に対する被曝が繰り返された結果として認められる皮膚の外見及び機能の変化を意味する。日光の構成要素

である紫外線（UV）、特に中間UV（UVBと呼ばれる、波長290-320nm）が主として光老化を引き起こす。光老化を引き起こすのに必要なUVBの被曝量は現在のところ知られていない。しかしながら、紅斑や日焼けを引き起こすレベルでのUVBに対する繰り返しの被曝が、通常光老化に結びつく。臨床的には、光老化は肌荒れ、しわの形成、斑の着色、土色化、たるみの形成、毛細管拡張症の発症、ほくろの発生、紫斑病の発症、傷つき易くなる、萎縮、纖維症的色素除去領域の発生、前悪性腫瘍及び悪性腫瘍の発症等として特定され得る。光老化は普通、顔、耳、頭、首、と手のような、日光に習慣的に曝される皮膚に起こる。

本発明の血管新生阻害剤又は抗老化剤中の血管新生を阻害する薬剤の配合量は、血管新生阻害剤全量中、乾燥物として0.0001~20.0質量%、好ましくは0.0001~10.0質量%である。

また、本発明の血管新生阻害剤又は抗老化剤には、上記必須成分以外に、通常化粧品や医薬品等の皮膚外用剤に用いられる成分、例えば、美白剤、保湿剤、酸化防止剤、油性成分、紫外線吸収剤、界面活性剤、増粘剤、アルコール類、粉末成分、色剤、水性成分、水、各種皮膚栄養剤等を必要に応じて適宜配合することができる。

その他、エデト酸二ナトリウム、エデト酸三ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ポリリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム、グルコン酸等の金属封鎖剤、カフェイン、タンニン、ベラパミル、トラネキサム酸およびその誘導体、甘草抽出物、グラブリジン、カリソの果実の熱水抽出物、各種生薬、酢酸トコフェロール、グリチルリチン酸およびその誘導体またはその塩等の薬剤、ビタミンC、アスコルビン酸リン酸マグネシウム、アスコルビン酸グルコシド、アルブチン、コウジ酸等の美白剤、グルコース、フルクトース、マンノース、ショ糖、トレハロース等の糖類、レチノイン酸、レチノー

ル、酢酸レチノール、パルミチン酸レチノール等のビタミンA類なども適宜配合することができる。

本発明の血管新生阻害剤又は抗老化剤は、例えば軟膏、クリーム、乳液、ローション、パック、浴用剤等、従来皮膚外用剤に用いるものであればいずれでもよく、剤型は特に問わない。

実施例

次に実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。配合量は質量%である。

実験1. (一次スクリーニング)

T S P - 1 誘導剤のスクリーニング

T S P - 1 プロモーターの下流にルシフェラーゼコード遺伝子をレポーター遺伝子として結合させたDNA構築体をH a C a T 細胞に安定的に導入した細胞株を用いた。上記細胞株をD M E M / F 1 2 (Invitrogen社) (10%のF B S 及び1mg/mlのヒグロマイシンB (Invitrogen社) 含有) 培地に懸濁し、24穴プレートに1穴あたり 4×10^4 細胞となるように播種した。約30時間後、培地を無血清D M E M / F 1 2 培地に換え、5%CO₂、37°Cで25時間培養した。その後、候補薬剤としての各種植物抽出物乾燥物を2質量%になるようにD M S O (和光純薬工業) 中に溶解させたものを、培養液の1000分の1、10000分の1又は100000分の1の容積量加えて24時間培養した。培養上清液を除去後、細胞をP B S で洗浄し、Luciferase Assay System (Promega社)を用いてルシフェラーゼ活性測定を行なった。そのルシフェラーゼ活性をもってT S P - 1 プロモーター活性とした。その結果、実験した各種植物抽出物のうち、タイソウエキス(1)、オタネニンジンエキス(2)、ローマカミツレエキス(3)、クロレラエキス(4)

)、セロリエキス(5)、パセリエキス(6)、ヨクイニンエキス(7)及びシルクエキス(8)(全て、一丸ファルコス社由来)等を含むいくつかが有効なTSP-1プロモーター活性を示した。これら生薬を用いた実験の結果を図1に示す。コントロールは、候補薬剤の代わりにDMSOを作用させたものである。

上述の通り、TSP-1誘導剤は必ずしも血管内皮細胞死を誘導しない。よって、TSP-1誘導のみならず、TSP-1機能(血管内皮細胞の細胞死)を発揮する薬剤をスクリーニングするために、我々は更に2次スクリーニングを実施した。

実験2. (二次スクリーニング)

アポトーシス誘導剤のスクリーニング

一次スクリーニングで薬剤添加(1000分の1)して24時間培養後の培養上清を、チャンバースライド上で約70%コンフルエントになるまで培養した血管内皮細胞HMVEC(三光純薬)に添加後、24時間培養して血管内皮細胞の細胞死誘導を検討した。細胞死の検出はApopTag Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kitを用い、細胞死誘導計算はそれぞれの薬剤添加群及びコントロール群の細胞死を起こしている細胞の割合を計算して行なった。計算方法はそれぞれの薬剤添加群及びコントロール群のスライドからそれぞれ3箇所の画像をデジタルカメラで取得し、夫々の画像における核数に対する細胞死シグナル数を計算してその割合(%)とした。

その結果、実験した各種植物抽出物のうち、タイソウエキス(1)、オタネニンジンエキス(2)、ローマカミツレエキス(3)、クロレラエキス(4)、セロリエキス(5)、パセリエキス(6)、ヨクイニンエキス(7)及びシルクエキス(8)が血管内皮細胞のアポトーシスを効果的に誘導することが明らかとなった。これら

生薬を用いた実験の結果を図2に示す。比較例として、候補薬剤の代わりに培地のみ（図中、右棒：10000分の1；左棒：100分の1）、DMSO（図中、右棒：10000分の1；左棒：1000分の1）又はTSP-1（1000分の1）（Haematologic Technologies, Inc.）を作用させた実験の結果も示す。

以上の2通りのスクリーニングの結果から、タイソウエキス、オタネニンジンエキス、ローマカミツレエキス、クロレラエキス、セロリエキス、パセリエキス、ヨクイニンエキス、シルクエキスがTSP-1を誘導し、且つ血管内皮細胞のアポトーシスを誘導するのに有効であることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

タイソウエキス、オタネニンジンエキス、ローマカミツレエキス、クロレラエキス、セロリエキス、パセリエキス、ヨクイニンエキス、シルクエキス等のTSP-1を誘導し、且つ血管内皮細胞のアポトーシスを誘導する薬剤は、老化を抑制するのに有効である。

請 求 の 範 囲

1. タイソウエキス (*Zizyphus jujuba* Miller var. *inermis* Rehder)、オタネニンジンエキス (*Panax ginseng* C.A. Meyer)、ローマカミツレエキス (*Anthemis nobilis* Linne)、クロレラエキス (*Chlorella vulgaris* Chick)、セロリエキス (*Aplum graveolens* Linne)、パセリエキス (*Petroselinum sativum* Hoffman)、ヨクイニンエキス (*Coix lacryma-jobi* Linne var. *ma-yuen* Stapf)、シルクエキス (*Bombyx mori* Linnaeus) から成る群から選ばれる 1 又は複数種の薬剤を含有することを特徴とする、血管新生阻害剤。
2. タイソウエキス、オタネニンジンエキス、ローマカミツレエキス、クロレラエキス、セロリエキス、パセリエキス、ヨクイニンエキス、シルクエキスから成る群から選ばれる 1 又は複数種の薬剤を含有することを特徴とする、抗老化剤。
3. しわの形成を防止又は抑制する、請求項 2 記載の抗老化剤。
4. 老化を抑制するための方法であって、請求項 2 記載の抗老化剤を皮膚に塗布すること含んで成る方法。

Fig.1

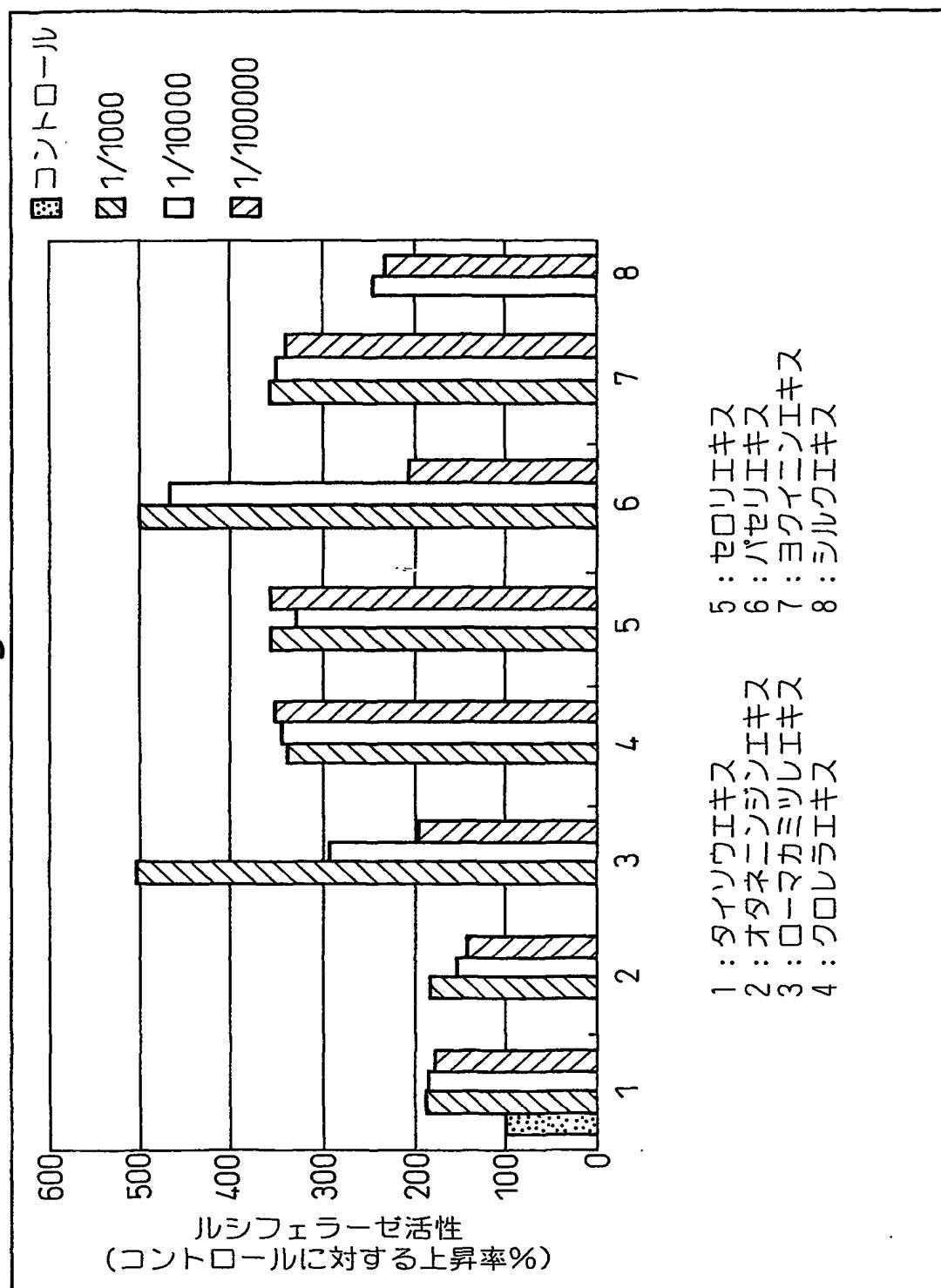


Fig.2

